



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

La lipasa B de *Candida antarctica* en la síntesis
biocatalizada de derivados del ibuprofeno

TRABAJO FINAL DE LA LICENCIATURA EN
BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CELINA JORDI

DIRECTOR: CARLOS LLERENA SUSTER

AÑO 2015

Agradecimientos

A Carlos Llerena Suster por haber sido mi director, y acompañarme todo este tiempo.

A toda la gente del CIPROVE por permitirme hacer el trabajo final y por la buena onda. A Mariana Tellechea por asistirme tantas veces en el laboratorio.

A mis padres Ana y Enrique, por haberme apoyado siempre en todo lo que decidí.

A mi familia platense, primos, tíos, abuelos, hermanos, por estar siempre, y hacer esas reuniones familiares tan lindas.

A todos mis compañeros y amigos en la carrera, que hicieron el paso por esta facultad más agradable. En especial a Flor Ceccacci e Iris Landivar que fueron grandes apoyos en los primeros años. A Soledad Lynn y Jorgelina Moreiras Clemente, con las que compartí no solo horas de estudio, sino que también comparto una gran amistad. A Florencia Fragapane, quién me acompañó en este último tramo. A Tulio y sus ángeles.

A todos mis compañeros de capoeira. A los amigos que conocí en todos estos años.

A todos los compañeros de SUMA que me enseñaron que ir a la facultad no es solo estudiar. Y a todos aquellos que lucharon y luchan por una universidad pública, gratuita y de calidad por y para el pueblo.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Biocatálisis.....	2
1.1.1. Enzimas. Catálisis enzimática.....	3
1.2. Lipasas.....	4
1.2.1. Reacciones catalizadas por lipasas.....	6
1.2.2. Aplicaciones biotecnológicas de lipasas.....	7
1.2.3. Lipasa B de <i>Candida antartica</i>	8
1.3. Ingeniería de medios y enzimática.....	12
1.3.1. Ingeniería de medios.....	12
1.3.2. Ingeniería enzimática. Biocatalizadores.....	13
1.3.2.1. Purificación.....	14
1.3.2.2. Inmovilización.....	14
1.3.2.2.1. Inmovilización por adsorción.....	17
1.4. Ibuprofeno.....	17
1.4.1. Resolución racémica de ibuprofeno.....	19
PURIFICACIÓN DE CALB.....	21
2. Purificación de CALB.....	22
2.1. Materiales y métodos.....	23
2.1.1. Purificación de CALB.....	23
2.1.2. Determinación del contenido de proteínas.....	24
2.1.3. Medidas de actividad enzimática.....	25
2.1.4. Electroforesis desnaturalizante.....	26
2.2. Resultados.....	27
2.2.1. Cromatografía de exclusión molecular.....	27
2.2.2. Determinación de proteínas.....	29
2.2.3. Actividad esterásica.....	30
2.2.4. Electroforesis desnaturalizante.....	31

2.3. Conclusiones.....	31
PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES.....	34
3. Preparación de biocatalizadores.....	35
3.1. Materiales y métodos.....	35
3.1.1. Inmovilización de CALB sobre TiO_2	35
3.1.2. Análisis de las muestras.....	36
3.1.3. Caracterización del biocatalizador.....	37
3.2. Resultados.....	38
3.2.1. Inmovilización de CALB sobre TiO_2	38
3.2.1.1. Determinación de proteínas.....	38
3.2.1.2. Actividad esterásica.....	39
3.2.2. Caracterización del biocatalizador.....	40
3.2.2.1. Retención de actividad.....	40
3.2.2.2. Desorción proteica.....	40
3.3. Conclusiones.....	41
ESTERIFICACIÓN DE IBUPROFENO.....	43
4. Esterificación de ibuprofeno.....	44
4.1. Materiales y métodos.....	44
4.1.1. Aplicación de los biocatalizadores en la esterificación enantioselectiva de ibuprofeno.....	44
4.1.2. Estudio de la cinética de esterificación.....	46
4.2. Resultados.....	46
4.2.1. Análisis de la esterificación de ibuprofeno.....	46
4.2.2. Estudio de la cinética de esterificación.....	47
4.3. Conclusiones.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50

INTRODUCCIÓN

1.1. Biocatálisis

La biocatálisis es el uso de enzimas para catalizar reacciones químicas. Es también conocida como catálisis enzimática o biotransformación. Este proceso aprovecha las enzimas que naturalmente cumplen funciones vitales en los seres vivos para catalizar la obtención de distintos productos orgánicos. Los biocatalizadores pueden ser, por lo tanto, un extracto enzimático más o menos purificado o todo el ámbito natural de las enzimas: células, tejidos u órganos.

Las enzimas son el núcleo de los procesos biocatalíticos, deben ser extraídas y caracterizadas para ser utilizadas en reacciones en ambientes controlados. Se pueden encontrar tanto en el interior de las células como en espacios extracelulares, pueden estar en gran abundancia o en cantidades mínimas, pueden estar asociadas a ciertas organelas o membranas o formando complejos enzimáticos o estar libres, pueden estar como proenzimas o pueden necesitar cofactores. Según el caso se tendrá que encontrar métodos adecuados para poder extraerlas, acondicionarlas y usarlas en biocatálisis. Por otra parte, el ambiente artificial o medio de reacción (sustratos, medio, temperatura, etc.) donde se usan puede permitir que, estos biocatalizadores, utilicen y produzcan sustancias distintas a las naturales, incluso para que actúen usando otros mecanismos catalíticos, ampliando de esa manera su rango de acción ¹.

Los beneficios del uso de enzimas y de otros biocatalizadores, comparado con los métodos químicos de síntesis, están ampliamente descritos en la bibliografía. La biocatálisis tiene especial importancia cuando las sustancias producidas mediante estos procesos no se pueden obtener de otra manera o cuando muestran ventajas económicas y/o ambientales con respecto a métodos de producción exclusivamente químicos. Las enzimas tienen altas enantio y regioselectividades, operan bajo condiciones suaves de reacción, por lo que hay un menor gasto de energía, lo que permite la reducción de los pasos de una síntesis orgánica y la disminución en la producción de desechos, entre otras ventajas ^{2, 3}. La incorporación de procesos biocatalizados en la

industria involucra varios de los principios de la Química Verde, especialmente la catálisis, la eficiencia energética y la menor derivatización. Por otra parte, se pueden combinar pasos biocatalizados con pasos químicos en la síntesis de un compuesto químico determinado.

Existe un interés particular en el empleo de biocatalizadores para crear nuevas rutas que disminuyan el uso de reactivos costosos, así como para obtener moléculas genéricas y/o complejas ⁴ empleadas en la producción de reactivos químicos, de intermediarios farmacéuticos y agroquímicos, principios activos farmacéuticos e ingredientes alimentarios ⁵. Por otro lado, el creciente interés por el uso de este tipo de procesos es debido a nuevos requerimientos industriales, como ser: una limitada vigencia de las patentes de los fármacos, la rápida elaboración de procesos para compensar los altos costos de desarrollo que deben afrontar las empresas farmacéuticas y la promoción de soluciones ecológicas que dejen rastros mínimos en el medio ambiente ^{6, 7}. La convergencia de la biología y la química ha abierto una gran cantidad de oportunidades a las que se puede apuntar, en tanto que los descubrimientos realizados a partir del estudio de la biodiversidad y los aportes de la biología molecular están extendiendo el espectro de los biocatalizadores disponibles que pueden adaptarse a los requerimientos industriales ⁸.

Se han empleado biocatalizadores en procesos tan diversos como en la producción de compuestos quirales, en la síntesis de polímeros, de péptidos, de antibióticos como la amoxicilina ⁶ de edulcorantes como el aspartamo ⁹ de ciclodextrinas; en biorremediación y la lista se sigue ampliando a diario ¹⁰.

1.1.1 Enzimas. Catálisis enzimática

Como se mencionó anteriormente, las enzimas son proteínas sintetizadas por las células de organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas *in vivo* ¹¹, capaces de catalizar reacciones *in vitro* en las que intervienen tanto sustratos naturales como no naturales ¹².

Las enzimas, como catalizadores, tienen las siguientes características ^{13, 14}:

- Poseen altas velocidades de reacción.
- Son selectivas.
- Se puede regular su actividad.
- Pueden necesitar cofactores, lo cual implica un encarecimiento del proceso biocatalizado.
- Requieren condiciones más suaves de reacción respecto a los catalizadores químicos.
- Se pueden utilizar varias enzimas en combinación para realizar transformaciones que ocurran en varios pasos sucesivos.
- Las enzimas se degradan en condiciones relativamente suaves, por lo que exigen un manejo más delicado que otro tipo de catalizadores.

La inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto a sustrato son los principales inconvenientes que presentan los procesos catalizados por enzimas.

Sin embargo, muchos de estos problemas se han superado con el objetivo de utilizar los biocatalizadores en procesos industriales a gran escala. Se han desarrollado técnicas que mejoran la estabilidad de las enzimas y que facilitan su recuperación y reutilización. Los avances de la biología molecular han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes y su expresión con el fin de obtener determinadas proteínas en grandes cantidades. Como consecuencia, el precio de las enzimas ha bajado. Además la ingeniería genética permite modificar la estabilidad, especificidad y otras características de las enzimas de manera de optimizar su performance en la reacción de interés.

1.2. Lipasas

Las lipasas o triacilglicerol lipasas son un grupo de enzimas cuya función biológica consiste en catalizar la hidrólisis reversible de triglicéridos de grasas animales y aceites vegetales para obtener como productos finales glicerol y

ácidos grasos libres o sus productos intermedios como mono y diglicéridos. Según la nomenclatura de IUBMB se clasifican en: Hidrolasas. Esterasas. Triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3) ¹⁵. De acuerdo la clasificación funcional son enzimas hidrolasas y dentro de ese grupo esterazas, por lo que pueden actuar sobre uniones éster.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y han sido aisladas de microorganismos, plantas y animales¹⁶. En el campo de la biocatálisis los mayores esfuerzos se han enfocado sobre las de origen microbiano debido a su gran accesibilidad y a que su producción pudo manipularse gracias a la ingeniería genética actual¹⁷. Se pueden encontrar en bacterias, levaduras y hongos, y la mayoría son lipasas exocelulares, es decir, atraviesan la membrana celular una vez sintetizadas y pasan al medio externo. Muchas de estas lipasas microbianas han sido purificadas y secuenciadas ^{18, 19}.

Todas las lipasas aceptan ésteres de cadena mediana (de 4 átomos de carbono, C4) a larga (C16), algunas son incluso capaces de hidrolizar ésteres de ácidos grasos muy largos (C22). La especificidad de sustrato (referida a la especie dadora del grupo acilo) está determinada por la forma del centro activo que impone las preferencias en el tamaño de cadena que acepta cada lipasa ²⁰.

Los triglicéridos suelen ser moléculas grandes que deben encajar en la cavidad del centro activo para que puedan ser hidrolizados correctamente. En el caso de la lipasa B de *Candida antarctica*, el centro activo se encuentra al final de un profundo y estrecho túnel que sólo es capaz de admitir triglicéridos de pequeño tamaño. En cambio, en la lipasa de *Candida rugosa*, el túnel que está en las inmediaciones del centro activo, es capaz de albergar una cadena de, al menos, doce átomos de carbono ²⁰.

Las lipasas muestran diferentes tipos de especificidad ²¹:

- 1) especificidad para un determinado lípido
- 2) especificidad para una determinada posición en un triglicérido
- 3) especificidad para un determinado ácido graso del triglicérido

1.2.1. Reacciones catalizadas por lipasas

La reacción que por naturaleza catalizan estas enzimas es la hidrólisis del enlace éster. Sin embargo, aunque son muy específicas en cuanto al enlace químico sobre el cual actúan también catalizan otras reacciones no necesariamente lipolíticas, lo que hace que esta clase de enzimas tenga una amplia utilización en reacciones diversas. En la **figura 1** se presentan las reacciones catalizadas por las lipasas.

La capacidad de estas enzimas para catalizar la reacción inversa permite desarrollar aplicaciones muy interesantes como la síntesis de ésteres, la transesterificación y la interesterificación ²². La concentración de agua en el medio de reacción determinará el desplazamiento del equilibrio hacia la síntesis o hidrólisis del enlace éster en estos sistemas.

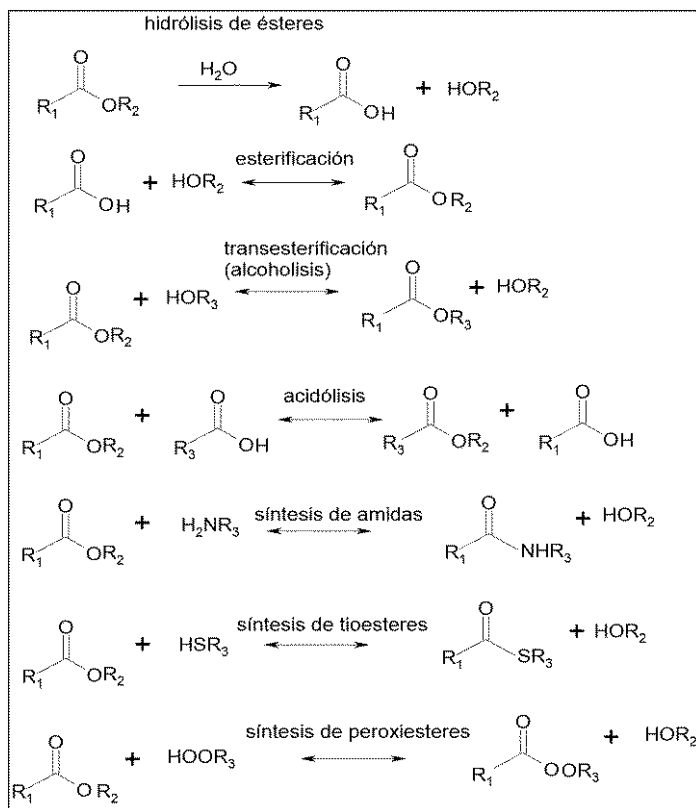


Figura 1. Reacciones catalizadas por lipasas

La transesterificación se define como una reacción de síntesis en la cual el sustrato donante del grupo acilo es un éster y se distinguen dos tipos de transesterificación según la especie aceptora del grupo acilo sea el glicerol (glicerólisis) o un alcohol (alcohólisis).

La interesterificación es un proceso útil para cambiar la composición de ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acilo se intercambia entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres.

1.2.2 Aplicaciones biotecnológicas de lipasas

Las razones del enorme potencial biotecnológico de las lipasas son su gran estabilidad en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, tienen una amplia especificidad de sustrato y presentan una elevada enantioselectividad²³.

Para evidenciar la importancia biotecnológica de estas enzimas en la **tabla 1** se indican los distintos tipos de reacciones con interés industrial catalizadas por ellas ²⁴.

Reacciones de hidrólisis	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica • Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria • Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasa • Finalidades analíticas para la determinación de la estructura de triglicéridos • Resolución de mezclas quirales
Reacciones de síntesis	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de triglicéridos • Síntesis de precursores de péptidos • Producción de esteroides para la industria farmacéutica • Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica • Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes • Síntesis de esteres glucídicos para la industria cosmética
Reacciones de interesterificación	<ul style="list-style-type: none"> • Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos • Eliminación de ácidos grasos responsables de causar inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas
Reacciones de transesterificación	<ul style="list-style-type: none"> • Preparación de compuestos enantioméricamente puros • Transesterificaciones enantioselectivas dobles

Tabla 1. Aplicaciones industriales de las lipasas

Actualmente el estudio de las lipasas se orienta, por un lado, a una serie de aplicaciones de química fina de interés fundamentalmente farmacéutico y básicamente en la resolución de compuestos enantioméricos.

1.2.3. Lipasa B de *Candida antarctica*

Candida antarctica es una levadura basidiomiceto que, como indica su nombre fue aislada en la Antártida con el propósito de encontrar enzimas capaces de operar en condiciones extremas para poder usarlas en formulaciones de detergentes ²⁵. A partir de esta levadura se han aislado dos lipasas, la lipasa A (CALA) y la lipasa B (CALB). La CALB es probablemente la más versátil de todas las lipasas empleadas en biotransformaciones

preparativas, ya que es mucho más termoestable que la mayoría de las lipasas y no depende de cationes metálicos ²⁶. La CALB presenta una preferencia sn-3 respecto a triglicéridos aunque su especificidad es más bien amplia hacia el sustrato donador de acilo y presenta un alto grado de selectividad hacia el sustrato alcohol ^{26, 27}. Resulta muy activa sobre un rango muy amplio de ésteres no naturales (ésteres simples, amidas y tioles) pero posee menor actividad frente a triglicéridos grandes ²⁶. Por otro lado, ha demostrado ser altamente estereoespecífica tanto en hidrólisis como en síntesis orgánica ²⁸. En la **tabla 2** se resumen algunas características de esta enzima.

	CAL B
Peso molecular (kD)	33
Punto isoeléctrico (PI)	6.0
pH óptimo	7
Actividad específica (LU/mg)	435
Termoestabilidad a 70 °C ^a20 min	15
.....120 min	0
pH estabilidad ^b	7-10
Activación interfásica	No
Especificidad posicional hacia triglicéridos	<i>Sn</i> -3

Tabla 2. Características de CAL B ²⁵.

^a actividad residual luego de incubación a 70 °C en buffer 0,1M Tris (pH = 7) durante 20 minutos y 120 minutos.

^b pH al cual más del 75% de la actividad es retenida durante incubación por 20 horas a temperatura ambiente

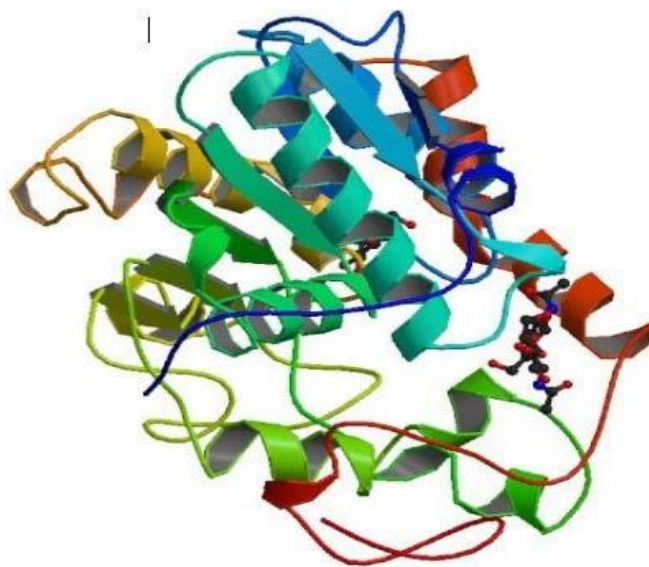


Figura 2. Estructura tridimensional de CALB (1TCB del PDB ²⁸)

Al igual que otras lipasas sigue un mecanismo de acción típico de serin-proteasas. La secuencia de aminoácidos no posee homología significativa con las secuencias de otras lipasas. En la estructura de esta enzima, el sitio activo es accesible al solvente externo mediante un estrecho canal. Los factores más importantes determinantes de la selectividad por el sustrato son la restricción física, la naturaleza hidrofóbica del bolsillo del sitio activo y el mecanismo de estabilización del intermedio tetraédrico. CALB, comparada con otras lipasas, tiene poco espacio en el bolsillo del sitio activo y su selectividad se asocia a este hecho ²⁶. Estudios por difracción de Rayos X han demostrado que el bolsillo del sitio activo está compuesto por dos canales, uno de ellos aloja al grupo acilo y el otro al grupo alcohol de la molécula de sustrato (éster) como puede verse en la **figura 3** ²⁹.

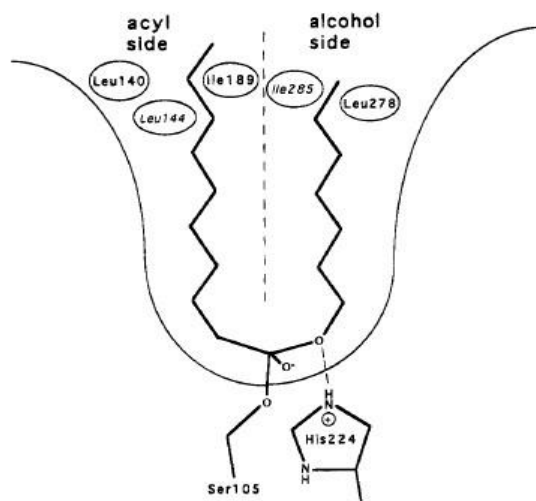


Figura 3. Esquema del sitio activo de CALB formado por dos canales paralelos²⁹.

En agua es una proteína excepcionalmente robusta que se desactiva a 50-60 °C (en forma inmovilizada el límite operacional aumenta a 60-80 °C) y también muestra una resistencia elevada a la desnaturalización por adición de disolventes orgánicos³⁰. En literatura se reporta que CALB ha sido empleada a temperaturas de 150 °C³¹ y en disolventes orgánicos de alta polaridad como acetonitrilo y dimetilsulfóxido y en fluidos supercríticos³².

En contraste con muchas otras lipasas esta enzima parece ser bastante rígida y no muestra un efecto de activación interfásial lo que la convierte en una especie intermedia entre una esterasa y una lipasa típica²⁶. La falta de activación interfásial en CALB es consistente con la ausencia de cambios estructurales observados en las estructuras cristalinas de rayos X con y sin inhibidor (análogo del estado de transición). Por lo tanto es posible que CALB no posea región de tapadera (lid) que regule el acceso al sitio activo. La estructura es como si estuviese siempre en conformación "abierta" con una entrada bastante restringida al sitio activo^{28, 29}.

1.3. Ingeniería de medios y enzimática

Para superar las variadas desventajas que surgen del uso de proteasas como biocatalizadores, mencionadas en la sección **1.1.**, se han impulsado numerosas investigaciones en torno a la ingeniería de los medios de reacción, de las enzimas e, incluso, de los sustratos empleados.

1.3.1 Ingeniería de medios

La ingeniería de medios se refiere a la posibilidad de influenciar las propiedades de la enzima alterando la naturaleza del solvente en donde la reacción se lleva a cabo ³³. Se puede manipular el medio de reacción para forzar la enzima a que catalice la reacción de síntesis ³. Distintos solventes orgánicos, actuando como cosolventes o como solventes puros, se han usado como medios de reacción para distintas enzimas. También se han utilizado medios acuosos congelados, soluciones orgánicas congeladas o sobreenfriadas, fluidos supercríticos, líquidos iónicos y sistemas de reacción sólidos ³⁴.

A pesar de que a primera vista los solventes orgánicos no siguen los principios de la química verde, existen numerosas e interesantes ventajas potenciales en el hecho de llevar a cabo reacciones biocatalíticas en mezclas de solventes acuoso-orgánicas o en solventes orgánicos puros ³⁵, como ser:

- (i) la alta solubilidad relativa de muchos compuestos en solventes orgánicos;
- (ii) la habilidad de revertir reacciones hidrolíticas, convirtiéndolas a sintéticas en medios no acuosos;
- (iii) la posibilidad de disminuir reacciones secundarias indeseables en medios orgánicos, tales como la hidrólisis enzimática del producto, así como la inhibición por sustrato y/o producto;
- (iv) la relativa facilidad en recuperar el producto y el biocatalizador de sistemas que contengan una fase orgánica.

La reducción de la actividad hidrolítica está directamente relacionada con la disminución de la actividad acuosa debido a la presencia del solvente orgánico. Se supone que el intercambio de agua por el solvente orgánico inerte disminuye la concentración y actividad del agua, reduciendo así la velocidad de las reacciones competitivas de hidrólisis ¹⁰. Por otro lado, la presencia de un solvente orgánico puede provocar alteraciones estructurales significativas en la molécula enzimática y, como consecuencia de ello, en sus propiedades catalíticas ^{36, 37}. En solventes orgánicos anhidros, las enzimas son considerablemente menos activas pero a la vez pueden ser mucho más estables que en medio acuoso, su selectividad (enantio, regio y quimioselectividad) puede variar significativamente y suelen exhibir el fenómeno conocido como memoria de pH respondiendo en su funcionalidad al valor de pH del medio desde el cual fueron precipitadas o liofilizadas ^{38, 39}. La biocatálisis en medio orgánico puede realizarse en fase homogénea, si el solvente es miscible con el agua ⁴⁰ o en fase heterogénea, cuando el solvente es inmiscible con el agua y ésta constituye una segunda fase que puede o no ser perceptible ⁴¹. Tanto en los sistemas homogéneos como heterogéneos la enzima puede encontrarse disuelta o insoluble en el medio de reacción, ya sea porque la proteína enzimática como tal es insoluble en dicho medio o porque se encuentra inmovilizada en un soporte sólido ³.

1.3.2. Ingeniería enzimática. Biocatalizadores

La ingeniería de enzimas se define como todas las estrategias destinadas a obtener un biocatalizador adaptado para llevar a cabo reacciones bajo las condiciones de síntesis, incluyendo modificaciones químicas y genéticas ³. Así se pueden tener enzimas más estables en los medios de síntesis, disminuir la hidrólisis competitiva, la proteólisis del producto, alterar la especificidad o enantioselectividad naturales de las enzimas, etc. ³⁴.

1.3.2.1. Purificación

Es importante saber el grado de purificación necesario para usar una enzima a la hora de plantear un proceso biocatalítico. Conviene ahorrar pasos de purificación (costosos y difíciles de escalar), si es posible, usando extractos crudos con un mínimo aislamiento. Esto no siempre es posible, ya que las enzimas útiles pueden estar en muy baja proporción, por lo que debemos concentrarlas, o porque pueden existir sustancias en los extractos crudos que interfieren de alguna forma en la acción enzimática (por ejemplo inhibidores). Por otra parte, en algunos casos los componentes del extracto crudo que acompañan a las enzimas pueden servir como una matriz protectora sobre las mismas ante efectos adversos durante la inmovilización, exposición a solventes orgánicos, etc. ⁴².

1.3.2.2. Inmovilización

Los métodos de inmovilización son muy frecuentes en la preparación de enzimas para su uso en distintos medios de reacción. Existen también estudios complementarios, donde en base a procesos muy simples como la liofilización, se logra mejorar mucho la actividad y estabilidad enzimática.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles en el medio de reacción que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente ⁴³.

La catálisis enzimática en fase heterogénea (enzimas inmovilizadas) ha permitido, por un lado, el uso más eficaz del catalizador al estabilizar la estructura proteica de la enzima, y por otro, el desarrollo de procesos continuos con todas las ventajas operacionales asociadas, haciendo del proceso biotecnológico un proceso económicamente rentable ⁴⁴. La inmovilización aumenta la estabilidad de las enzimas e incluso permite usarlas en condiciones de altas temperaturas y mayores rangos de pH. En reacciones llevadas a cabo

en medios orgánicos la inmovilización protege a las enzimas de la desnaturalización y previene la aglomeración aumentando el área efectiva disponible para la catálisis ⁴⁵. Este método también facilita la reutilización del biocatalizador, la separación de la enzima y los productos del medio de reacción y la disminución de las limitaciones en la transferencia de masa ⁴⁶.

En la **Tabla 3** se enumeran algunas de las ventajas y desventajas del uso de enzimas inmovilizadas en comparación a las enzimas libres ⁴⁷.

Enzima Soluble		Enzima Inmovilizada	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Menor costo • Utilizable en caso de sustrato con alto peso molecular • No existen pérdidas de actividad (mayor actividad específica) 	<ul style="list-style-type: none"> • Gran cantidad de enzima remanente en el producto luego de finalizada la reacción • No es posible la reutilización de la enzima • La reacción podría estar limitada por inhibición por producto • Dificultad de un control preciso • Es necesario detener la reacción enzimática (calor, cambio en el pH), lo cual puede afectar al producto 	<ul style="list-style-type: none"> • La enzima es reutilizable • La reacción puede terminarse separando la enzima del sustrato • El control es más preciso • Menor impacto de la inhibición por producto • Mayor estabilidad a condiciones de temperatura y pH • Puede usarse en forma batch o continua • Existe una gran flexibilidad en el diseño de reactores 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de capacidad catalítica durante el proceso de inmovilización • Presencia de restricciones difusionales o estéricas • Inactivación con una operación continua • Mayor costo, debido al soporte y proceso de inmovilización • Necesita control del estado sanitario durante el proceso

Tabla 3. Ventajas y desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas. Comparación con las enzimas libres

Se pueden clasificar los diversos métodos de inmovilización en función de la presencia o ausencia de soporte, de las características del mismo, del tipo de unión implicado en la inmovilización, etc.

Entre los métodos en ausencia de un soporte se encuentran la liofilización enzimática con distintos co-liofilizadores como éteres corona, surfactantes, etc., la formación de cristales enzimáticos entrecruzados (CLECs) y agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), y la unión a las enzimas de PEG o similares.

Por otra parte, los métodos que involucran soportes se clasifican según la unión de la enzima con el soporte: covalente, por adsorción o por entrapamiento.¹

Es importante evaluar las diferentes propiedades de los soportes a usar, entre ellas relación superficie/volumen, capacidad de unión de proteínas, compatibilidad e insolubilidad en el medio de reacción, estabilidad mecánica y química, posibilidad de reconversión luego de su uso, flexibilidad conformacional ⁴⁸. En la **Tabla 4** se nombran y clasifican distintos tipos de soporte usados para inmovilizar enzimas ⁴⁷.

Soportes inorgánicos		Soportes orgánicos	
Naturales	Manufacturados	Polímeros naturales	Polímeros sintéticos
<ul style="list-style-type: none"> • Bentonita • Piedra pómez • Sílice, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Óxido de metales • Vidrios porosos • Vidrios no porosos • Alúmina • Cerámicas • Gel de sílice, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.) • Proteínas fibrosas (colágeno, queratinas, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Poliolefinas (poliestireno) • Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) • Otros (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.)

Tabla 4. Tipos de soportes utilizados en los procesos de inmovilización.

1.3.2.2.1. Inmovilización por adsorción

En el presente trabajo se inmovilizó la enzima CALB por adsorción en una matriz de TiO₂, por lo cual se detalla solo este método.

La inmovilización por adsorción es una técnica muy simple en la cual se ponen en juego interacciones iónicas y otras uniones débiles como puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals entre enzima y soporte. Esta inmovilización es una técnica suave y en general no afecta la actividad enzimática, ya que se generan interacciones muy similares a las que se establecen en membranas biológicas ⁴⁹.

Las ventajas asociadas con este tipo de procesos son su bajo costo, fácil preparación, ausencia de cambios de especificidad enzimática y la obtención de derivados estables en medios con bajo contenido acuoso. En tanto que la débil unión de la enzima al soporte, la obtención de derivados poco estables mecánicamente y la complejidad de optimizar las variables que controlan dicho proceso, son claros inconvenientes que limitan su aplicación ⁵⁰.

Se ha estudiado la inmovilización por adsorción sobre soportes sólidos tales como poliamida, celite, vidrio poroso, sílica, titania, zeolitas, polipropileno o alúmina. En estos casos, el grado de activación enzimática y estabilización depende estrictamente de la naturaleza de la matriz sólida ⁵¹.

1.4. Ibuprofeno

El ibuprofeno, ácido (±)-2-(p-isobutilfenil) propanoico, es el nombre genérico de la droga que compone medicamentos como el Ibupirac[®], Sindol[®], Ibuevanol[®], Matrix[®] entre otros. Esta droga pertenece a la familia de los antiinflamatorios no-esteroides o AINES que se caracterizan por su actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica por lo que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa ⁵².

En su mayoría las formas farmacéuticas consisten en las mezclas racémicas de los enantiómeros R(-) y S(+), sin embargo está bien documentado que la forma S(+) es la farmacológicamente activa para todos ellos ^{14, 53}. En el caso específico del ibuprofeno se ha determinado que el S(+)-ibuprofeno es 160 veces más activo que su enantiómero ⁵³.

Los efectos adversos más importantes del uso del ibuprofeno son:

- *Tracto gastrointestinal*: el efecto adverso más frecuente asociado con el uso de los AINEs se relaciona con la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal que puede producir hemorragias y úlceras asociados a tratamientos crónicos ^{14, 54}. Estos efectos han sido mayoritariamente atribuidos a la acidez generada por el ibuprofeno ⁵⁵.

- *Efecto renal*: este efecto se dan en personas que presentan una enfermedad renal de base. Se disminuye la cantidad de prostaglandinas, lo cual genera una disminución del filtrado glomerular que conduce a aumento de presión arterial e hiperpotasemia ¹⁴.

En base a lo expuesto, un tratamiento farmacológico con el isómero S(+)-ibuprofeno puro tendría las siguientes ventajas:

- Reducción de la dosis administrada
- Disminución de efectos secundarios gastrointestinales directos
- Disminución de potenciales efectos adversos asociados a la acumulación de ibuprofeno en tejido adiposo
- Se evitaría la variabilidad de respuesta al no producirse la inversión in vivo
- Disminución del tiempo requerido para el desarrollo de la acción terapéutica deseada.

Todas estas ventajas muestran con claridad la importancia de la obtención de enantiómeros simples y justifican el interés desarrollado en las últimas décadas por la obtención de ácidos S(+)-2-aril propiónicos puros ²¹.

1.4.2 Resolución racémica de ibuprofeno.

La resolución racémica es la ruta más prometedora para la obtención de enantiómeros puros a escala industrial y ha sido objeto de extenso estudio en los últimos años para múltiples casos, entre ellos el (R/S)-ibuprofeno.

En la **figura 4** se muestran las principales técnicas empleadas para llevar a cabo una resolución racémica.

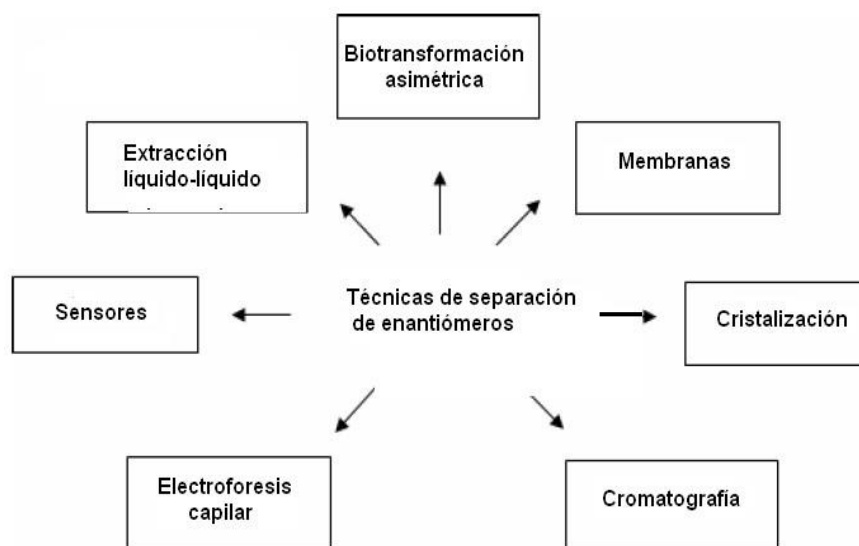


Figura 4. Técnicas usadas para la separación de enantiómeros ¹¹

Métodos cromatográficos: el método más común hasta la fecha para la resolución enantiomérica del ibuprofeno y demás materiales quirales en general es la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) ¹¹.

La desventaja de estos métodos radica principalmente en el tiempo requerido y sobre todo en la cantidad de solvente orgánico involucrado que luego de la separación debe ser evaporado a fin de extraer el ácido libre. Este método también se utiliza para el análisis de enantioselectividad luego de una resolución racémica.

Resolución cinética enzimática: La aplicación de lipasas permite usar distintas estrategias para la resolución racémica como la hidrólisis

enantioselectiva, a partir de un éster racémico en un medio acuoso; la síntesis enantioselectiva del éster, a partir de un ácido racémico o una transesterificación en medio orgánico. Dependiendo de la lipasa elegida como biocatalizador se obtendrá S o R estereopreferencia. Las lipasas principalmente empleadas en la resolución de profenos son las lipasas de *Candida rugosa* y de *Rizhomucor miehei*, las cuales esterifican al S(+)-ibuprofeno, y la lipasa B de *Candida antarctica* que cataliza la esterificación del R(-)-ibuprofeno, este último caso es ventajoso porque directamente queda sin reaccionar el isómero de interés ⁵⁶.

Debido a las condiciones suaves en las cuales estos biocatalizadores operan, si la enzima se emplea inmovilizada se tiene la posibilidad de recuperarla fácilmente del medio de reacción, facilitando la separación de productos como también reciclaje del catalizador. La inmovilización también permite una operación continua y mayor variabilidad de diseño de reactores como también mayor estabilidad enzimática en medios no convencionales. Por otro lado deben mencionarse las desventajas, que en este caso están relacionadas con el gran número de parámetros que deben ser optimizados (contenido de agua, solvente, temperatura, relación molar de sustratos, presencia de inhibidores, cantidad de catalizador, concentración de alcohol, etc.) para cada sistema de reacción en particular ^{11, 56}.

En los resultados reportados en los últimos 20 años respecto a la resolución racémica de ibuprofeno empleando enzimas se puede apreciar que la esterificación de (R/S)-ibuprofeno por vía enzimática ha sido llevada a cabo casi exclusivamente en un medio compuesto por un solvente orgánico siendo los solventes más utilizados ciclohexano e isooctano. Si bien operando en medio orgánico se han reportado altas conversiones de ácido y elevadas enantioselectividades, el uso de un co-solvente orgánico implica asumir el costo del mismo, de las operaciones de transporte, separación y reciclado; y el riesgo de que se produzcan fugas nocivas tanto para individuos como para el medio ambiente ⁵⁷.

PURIFICACIÓN DE CALB

2. Purificación de CALB

En función de sus numerosas aplicaciones, se han desarrollado distintas técnicas de ingeniería genética para obtener la CALB en laboratorios o comercialmente expresándola en otros microorganismos como *Pichia pastoris* ⁵⁸ o *Aspergillus niger* ⁵⁹. En este sentido cobra importancia contar con métodos eficientes y económicos de purificación que nos permitan obtener CALB con un alto grado de pureza a partir de extractos crudos provenientes de los caldos de cultivos de las especies mencionadas.

En este trabajo utilizaremos una muestra comercial de CALB de Lipozyme®, la cual posee: sólidos orgánicos totales (TOS) (4%), glicerol (25%), sorbitol (25%), agua (46%), benzoato de sodio (0,2%) y sorbato de potasio (0,1%) de acuerdo al documento técnico de Novozymes ⁵⁹.

En particular, resulta necesaria la separación del benzoato y el sorbato del extracto enzimático ya que estas sustancias interfieren en algunas medidas de cuantificación de proteínas, tales como la absorbancia a 280 nm. Por otra parte, también pueden resultar interferentes en las reacciones catalizada por CALB ⁶⁰. Estos componentes, cuya función en el extracto es de conservantes, permanecen en el extracto luego de pasos de centrifugación y precipitación.

Dada la composición descrita, se seleccionó cromatografía de exclusión molecular como método de purificación ya que nos permitirá separar proteínas y ácidos nucleicos de distintos tamaños y, principalmente, la gran cantidad de pequeñas moléculas presentes en el extracto crudo ⁶¹.

Por otra parte, la importancia de la obtención de la CALB pura radica en el hecho de poder obtener muestras para analizar mediante estudios estructurales tanto en enzimas libres como inmovilizadas.

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Purificación de CALB

Se utilizó lipozime[®] CALB L, un concentrado comercial, como material inicial.

En el primer paso de la purificación se colocó 1 mL del extracto crudo comercial (**E**) en un tubo eppendorf[®], se centrifugó a 10000 rpm y 4°C durante 30 minutos en una centrífuga refrigerada Hermle. Se tomó el sobrenadante. De esta forma se eliminaron los componentes insolubles del extracto, los cuales quedaron en el precipitado.

En el siguiente paso de la purificación, se tomó el sobrenadante obtenido (**EC**) y se sembró en una columna cromatográfica de exclusión molecular XK 16/40 (GE Healthcare) rellena con Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare) cuyo volumen fue de 47 ml. La cromatografía fue realizada en un equipo ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare).

Se utilizó como fase móvil el buffer volátil acetato de amonio – amoníaco (NH₄Ac / NH₃) 0,1 M a pH 8,1. La muestra se eluyó con 1,5 volúmenes de columna de este buffer a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min.

La salida de la columna estuvo acoplada a un medidor de espectro que mide la absorbancia de la fracción eluída. Se colectaron los picos en los cuales se observó absorbancia a 280nm.

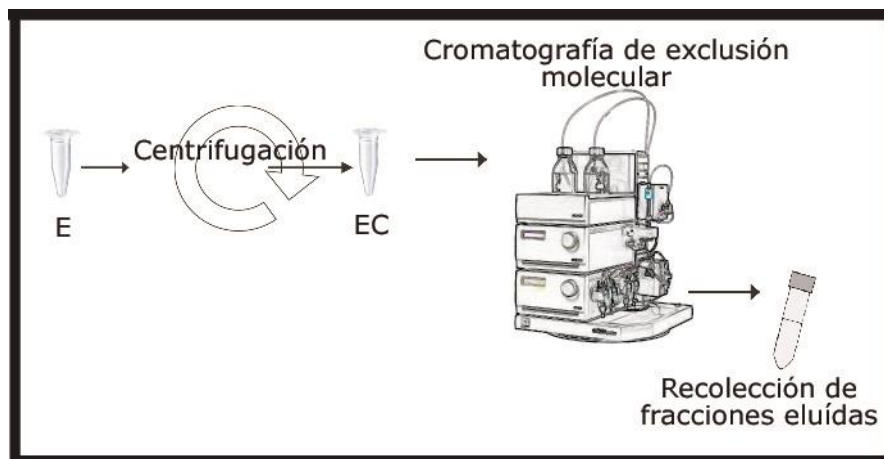


Figura 1. Esquema de purificación de la CALB

La fracción conteniendo la enzima CALB fue liofilizada para separar tanto el agua como los componentes del buffer y se conservó a 4°C.

2.1.2. Determinación del contenido de proteínas.

El contenido proteico se determinó mediante el método de Bradford⁶². Debido a que la enzima CALB, con este método, posee una curva de calibración distinta a la que se construye usando la proteína patrón seroalbúmina bovina (BSA) ⁶³, se realizó una curva utilizando como patrón CALB pura comercial (Sigma Chemical Company). Para esto, se prepararon soluciones de distintas concentraciones entre 0,1 y 1 mg/mL a partir una solución de la enzima pura comercial en agua destilada. Se mezclaron 50 µL de cada solución con 2,5 mL del reactivo de Bradford, se dejó reposar durante 20 min y se midió la absorbancia a 595 nm. Cada muestra se analizó por cuadruplicado. Con los valores de absorbancia medidos y la concentración de cada muestra se construyó la curva de calibración del método.

Luego se determinó la concentración proteica de las soluciones iniciales de extracto crudo (**E** y **EC**) y de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular siguiendo el mismo protocolo.

2.1.3. Medidas de actividad enzimática.

Para determinar la eficiencia de la purificación se midió la actividad esterásica de las soluciones iniciales **E** y **EC** y de las distintas fracciones obtenidas en la cromatografía. Se utilizó laurato de *p*-nitrofenilo (pNfL) (Sigma) como sustrato. La hidrólisis del mismo produce *p*-nitrofenol, el cual puede ser cuantificado midiendo la absorbancia a 405 nm.

Las mezclas de reacción (MR) contienen:

2,7 ml	Buffer Tris-HCl pH 8.0 Tritón X-100 0,0075 %v/v
100 µl	Muestra
200 µl	pNfL 2 mM en ACN:Isopropanol 20:80

Tabla 1. Contenido de la mezcla de reacción para medida de actividad enzimática.

En los ensayos blanco se usaron 2,8ml del buffer y 200 µl de sustrato.

Para llevar a cabo cada ensayo, se colocaron el buffer y la muestra en una cubeta de 3ml en un espectrofotómetro Agilent 8453 calefaccionado a 37°C para mantener la temperatura constante durante todo el ensayo. Se agregó el sustrato (pNfL) y se comenzó la lectura cinética de la absorbancia a 405 nm cada 5 seg. durante 90 seg. Cada muestra se analizó por cuadruplicado.

Una vez obtenidas las curvas cinéticas de Unidad de absorbancia versus tiempo (UAbs/seg), se determinó la pendiente en la zona lineal y se calculó el valor de actividad en UI (micromoles de producto/min en la MR) en cada ensayo. Se usó un ϵ 17983 M⁻¹ .cm⁻¹ obtenido mediante una curva de calibración de pNfL en la misma solución del ensayo ⁶³.

2.1.4. Electroforesis desnaturalizante

Para profundizar el estudio de la purificación se realizó un SDS-PAGE de las muestras. Se utilizó un equipo BioRad MiniProtean®III. Se prepararon los geles de stacking y resolución según lo detallado en las **tablas 2.a. y 2.b.**

Componente	Cantidad
Acrilamida : Bisacrilamida (30:08)	3,5 ml
Buffer Tris – HCl 3M pH 8,8	0,94 ml
Agua	2,62 ml
SDS 10%	75 µl
Temed	4 µl
Persulfato 1,5%	375 µl

Tabla 2.a. Composición del Gel de resolución

Componente	Cantidad
Acrilamida : Bisacrilamida (30:08)	1,16ml
Buffer Tris - HCl 0,5M pH 6,8	0,87 ml
Agua	4,53 ml
SDS 10%	70 µl
Temed	4 µl
Persulfato 1,5%	350 µl

Tabla 2.b. Composición del gel de Stacking

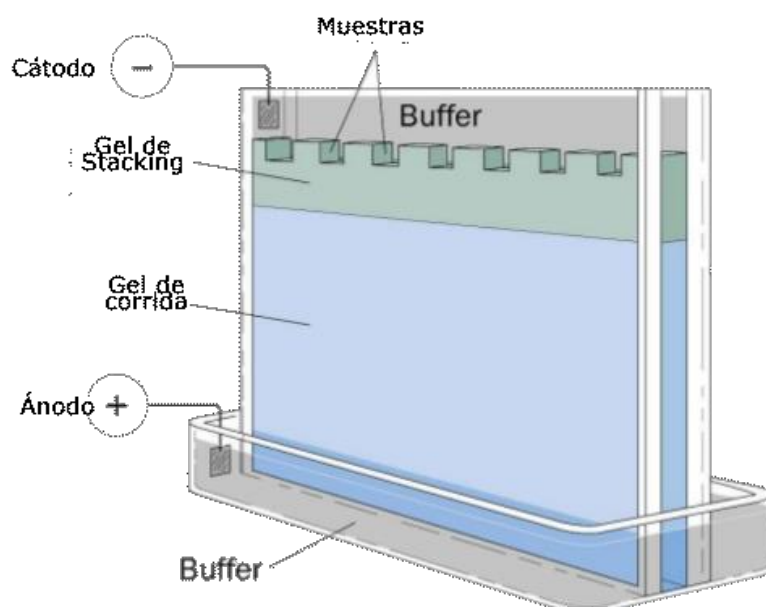


Figura 2. Esquema de la electroforesis

Para la preparación de las muestras a sembrar, se mezclaron 50 μ L de cada solución con 350 μ L de agua, 100 μ L del buffer de muestra descrito en el **tabla 3** y se calentaron a 100°C durante 10min. El calentamiento, junto al SDS y el β -mercaptoetanol garantizan la desnaturalización y despliegue de las proteínas presentes en las muestras.

Componente	Cantidad
Tris	393,7 mg
SDS	1 g
β -mercaptoetanol	2,5 mL
Glicerol	4,0 mL
Azul de bromotimol	3 mg
Agua	30 mL
HCl hasta pH 6,8	

Tabla 3. Composición del buffer de muestra (x6)

Se sembraron 10 μ L de las muestras preparadas en cada calle junto con 3 μ L un patrón comercial de pesos moleculares entre 14 y 90 kDa (GE-Healthcare).

Se usó un buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,8 con SDS para realizar la corrida electroforética. La misma se inició con una corriente de 30 mA durante la corrida en el gel de staking y de 60 mA durante en el gel de resolución.

Luego de la electroforesis el gel se tiñó con una solución colorante basada en Coomassie Brilliant Blue R-250 (USB) para visualizar las proteínas.

2.2. Resultados

2.2.1 Cromatografía de Exclusión Molecular

En la **figura 3** se muestra el perfil de absorbancias en función del volumen de elución de la cromatografía de exclusión descrita.

En el cromatograma se pueden apreciar 4 picos. El primero (**P1**) presentó un máximo a los 17 ml y muestra valores similares de absorbancia a 260 y 280 nm. El máximo del segundo pico (**P2**) eluyó a los 22 ml. EL pico 3 (**P3**), que es el que presenta mayores niveles de intensidad en la absorbancia a 280nm, eluye a los 26ml. Estos dos picos (**P2** y **P3**) muestran una absorbancia mayor a 280 nm que a 260 nm. Se ve un cuarto pico extendido entre los 41,5 y 62,5 ml donde se observan niveles muy altos de intensidad de absorbancia principalmente a 260 nm.

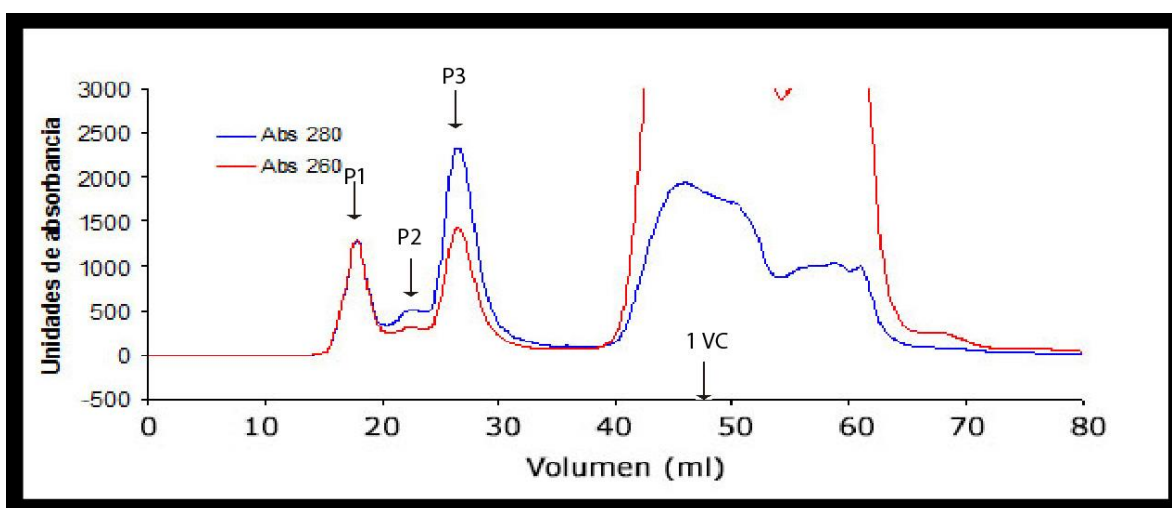


Figura 3. Cromatografía de exclusión molecular del extracto centrifugado (**EC**)

La relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm permite suponer que los componentes de **P3** y **P2** son principalmente proteicos, dado la mayor absorbancia a 280 nm. La misma relación estaría indicando que en **P1** habría presencia de ácidos nucleicos dado que poseen un máximo de absorbancia a 260 nm, y, por otro lado, dichos ácidos serían de un tamaño mayor que las proteínas por lo que eluyen antes de la columna. El pico 4 eluye en torno a un volumen de columna por lo que se puede considerar que se compone de sustancias de bajo peso molecular; por gran la intensidad de absorbancia y la amplitud del

pico estarían en gran cantidad en la muestra. Dada la información que se tiene del extracto ⁵⁹ se puede suponer que entre esas sustancias están los conservantes sorbato de potasio y benzoato sódico, ya que los mismos presentan máximos de absorbancia en 260 y 230 nm.

2.2.2. Determinación de proteínas

Con los datos obtenidos a partir del ensayo de Bradford sobre las diluciones realizadas a partir de la CALB pura se construyó la siguiente curva de calibración:

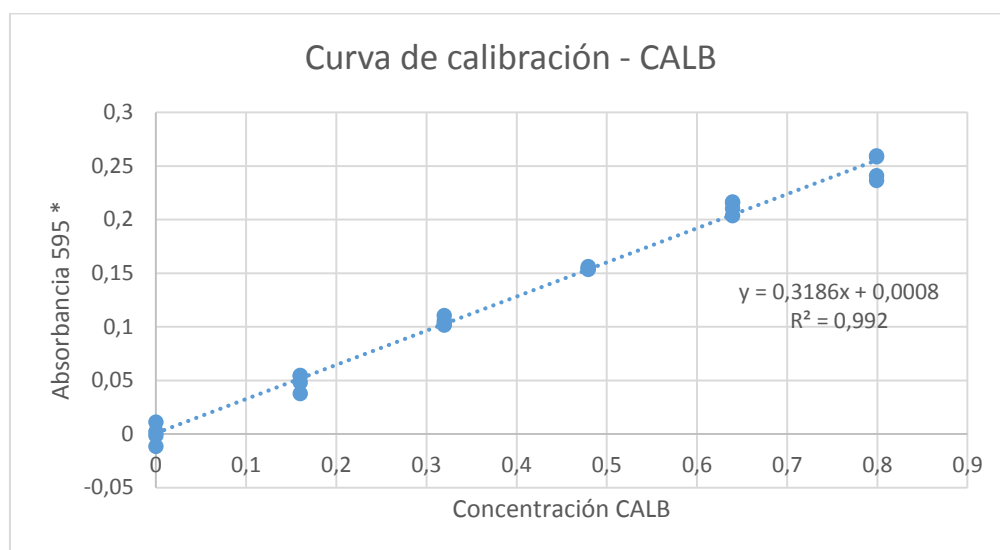


Figura 4. Curva de calibración del Método de Bradford con CALB pura.

* Calculada a partir de la diferencia entre la absorbancia de las muestras y los blancos

Utilizando esta curva de calibración se determinó el contenido proteico de las muestras **E** (en 1 ml), **EC** (en 1 ml), **P1**, **P2** y **P3** (en el volumen total recolectado). Estos valores se muestran en la **figura 5**.

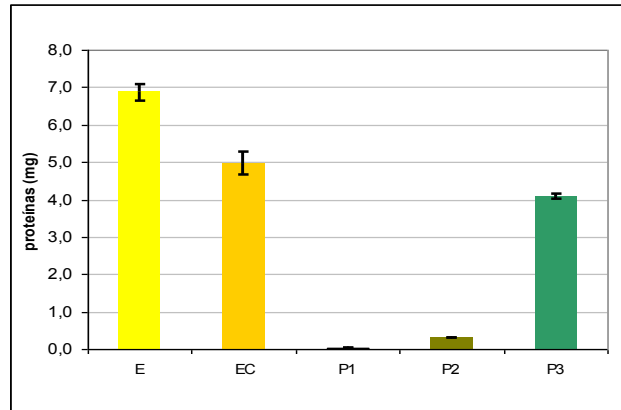


Figura 5. Contenido proteico en las muestras **E, EC, P1, P2 y P3** determinado mediante el método de Bradford.

Se observa que en el paso de centrifugación hay una pérdida considerable de proteínas que quedan en el sólido que se descarta. Por otra parte, se evidencia que la mayor cantidad de proteínas sembradas sale en el pico 3 tal como se advertía por el perfil de absorbancia de la cromatografía. Es remarcable, también, que el contenido proteico en el pico 2 es mayor que en el pico 1 a pesar de que en el cromatograma la relación de áreas está invertida. Este resultado nos permite suponer que el pico 1 contiene principalmente ácidos nucleicos como se había mencionado anteriormente.

2.2.3. Actividad esterásica

En la **figura 6** se muestran los resultados de las medidas de actividad específica realizadas sobre las muestras.

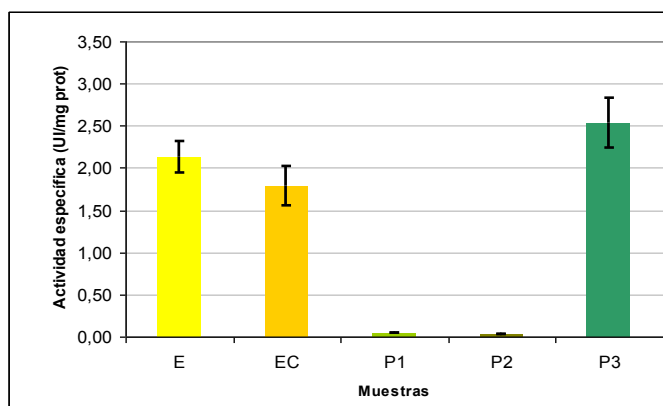


Figura 6. Valores de actividad específica de las muestras **E**, **EC**, **P1**, **P2** y **P3** expresados como UI por mg de proteína

Como se esperaba, se observan valores de actividad esterásica para las muestras **E** y **EC**. Por otra parte, se comprueba que la lipasa eluye principalmente en el pico 3, ya que en el mismo se observa una actividad aun mayor que la observada en **E**, mientras que en **P1** y **P2** la actividad es prácticamente nula.

2.2.4. Electroforesis desnaturalizante

En la **figura 7** se muestra el SDS-PAGE con **E**, **EC** y **P3** (por duplicado) y un patrón de peso molecular.

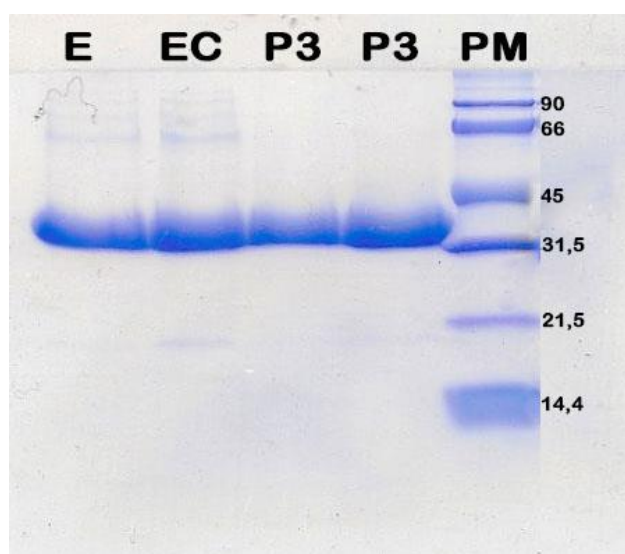


Figura 7. SDS-PAGE. 1. **E**; 2. **EC**; 3. **P3**; 4. **P3**; 5. Marcadores de peso molecular (en kDa).

En todas las muestras se puede observar la presencia de una banda entre 31,5 y 45 kDa que correspondería a CALB (33,5 kDa). Sin embargo, mientras en **E** y **EC** se observan bandas contaminantes a mayores y menores PM, las cuales no se observan en **P3**. Además de la separación de sustancias pequeñas y ácidos nucleicos evidenciada por los estudios anteriores, el SDS-PAGE muestra que también se logra separar a la CALB de otras proteínas del extracto crudo.

2.3 Conclusiones

Se desarrolló un método adecuado para purificar CALB desde cultivos celulares. El método consta de sólo dos pasos. Se parte de un extracto crudo comercial, se realiza una centrifugación y posteriormente se realiza una cromatografía de exclusión molecular.

Mediante los análisis de absorbancia a 280 nm y 260 nm de la cromatografía de exclusión molecular se observa que el pico 3 posee una alta concentración proteica. Los ensayos de actividad enzimática y contenido proteico son consistentes con este resultado, mostrando que el mayor porcentaje de CALB estaría en el pico 3. En el SDS-PAGE podemos observar una buena purificación de la lipasa, con eliminación de impurezas en la etapa de la cromatografía de exclusión.

Con los datos de cantidad de proteínas y de actividad enzimática se elaboró la siguiente tabla de purificación:

Muestra	Procedimiento	Proteínas (mg)	Rendimiento (%)	Actividad específica (UI/mg)	Grado de purificación
E		13,72	100	2,1	
EC	Centrifugación	9,95	72,5	1,8	0,84
P3	Exclusión	8,18	59,6	2,5	1,19

Tabla 4. Seguimiento de la purificación

Se observa una pérdida de aproximadamente el 40% de proteínas después de estos 2 pasos de purificación, siendo la caída más importante el paso de centrifugación inicial. La actividad específica sólo aumenta levemente (1,19). Se podría explicar este comportamiento considerando que en el extracto las proteínas son mayoritariamente CALB, de manera que los pasos de purificación no separan prioritariamente otras proteínas (lo que provocaría un aumento relativo de la actividad) sino otras sustancias como ácidos nucleicos, conservantes, sales, constituyentes celulares, etc.

La metodología propuesta muestra una alternativa eficiente para la purificación de CALB.

PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES

3. Preparación de biocatalizadores

En el presente capítulo se expondrá un protocolo de preparación de biocatalizadores basados en la enzima CALB. Esta preparación consta de la adsorción simple de la lipasa sobre TiO_2 como soporte.

Se analizará la cantidad de CALB adsorbida en el proceso, cuantificando la enzima remanente.

Además se estudiará mediante distintas técnicas la actividad del biocatalizador y la desorción de la enzima en este soporte.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1 Inmovilización de CALB sobre TiO_2

Se estudió la inmovilización de CALB sobre TiO_2 utilizando como fuente de la enzima el extracto crudo centrifugado (EC) y la enzima purificada obtenida por el protocolo del capítulo anterior.

Se prepararon 21 mL de las solución enzimáticas a inmovilizar. De cada una reservó 1 mL de esta solución (**t₀**) para analizar.

Para cada ensayo se colocaron, en un frasco de vidrio, 100 mg de TiO_2 (Aeroxide® P-18 Evonik Ind., $43.1 \pm 0.1 \text{ m}^2/\text{g}$) y los 20 mL restantes de las soluciones preparadas. La mezclas se incubaron durante 1 hora a 30°C con agitación magnética.

Al finalizar, se centrifugaron durante 20 min. a 10000 rpm y 4°C . Se separaron los sobrenadantes (**SN1**) para analizar. Para lavar el sólido se resuspendieron en 10 mL de agua destilada y se centrifugaron en las mismas condiciones. Se separaron los sobrenadante (**SN2**) para analizar y los sólidos se liofilizaron y almacenaron a 4°C .

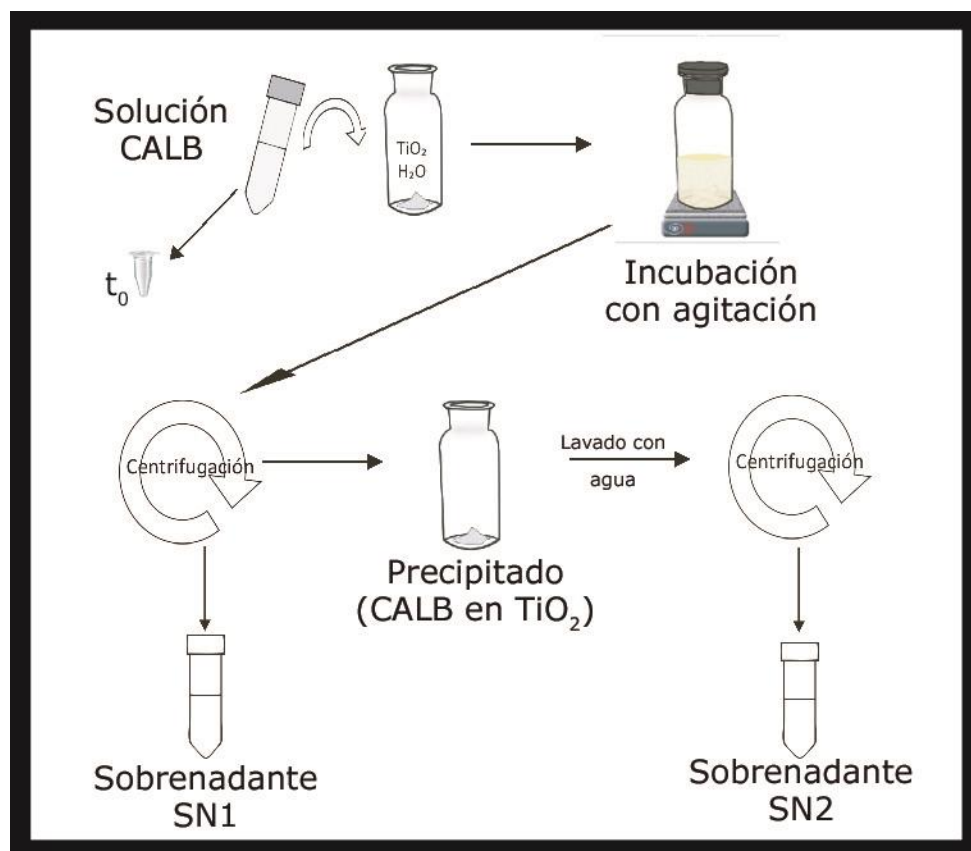


Figura 1. Esquema de la inmovilización

3.1.2. Análisis de las muestras

Para conocer los componentes adsorbidos al sólido y los remanentes en los sobrenadantes se analizaron las muestras **t_0** , **SN1** y **SN2**. Se determinaron sus concentraciones proteicas y sus actividades esterásicas siguiendo las metodologías descritas en el capítulo anterior (Secciones 2.1.2. y 2.1.3.).

3.1.3. Caracterización del biocatalizador

Se midió la actividad del biocatalizador preparado usando pNfL como sustrato. En la **tabla 1** se muestra la composición de la mezcla de reacción.

17,1 mL	Buffer Tris-HCl pH8.0 con Triton X-100 0,0075%v/v
2,5 mg	Biocatalizador
0,9 mL	pNfL 2mM en ACN:Isopropanol 20:80

Tabla 1. Contenido de la mezcla de reacción para medida de actividad

Previamente al ensayo, se incubaron el buffer y el biocatalizador a 37°C con agitación magnética, durante 1 hora, para disgregar el sólido antes de realizar la medida de actividad.

Para comenzar la medida se agregó el sustrato y se tomaron 10 muestras de 1 mL a distintos tiempos durante 10 min, tomando la primer muestra 30 segundos después del agregado de sustrato. Las muestras se colocaron inmediatamente en baño de hielo para frenar la reacción.

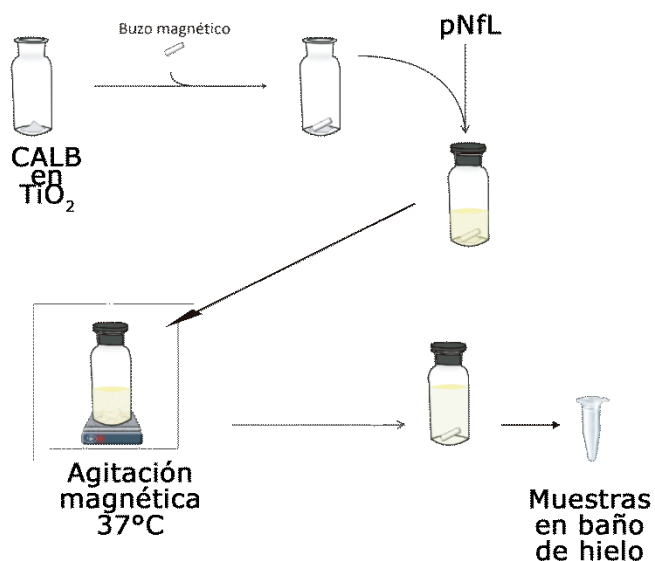


Figura 2. Esquema del protocolo para medida de actividad

Cada muestra fue centrifugada 10 min a 10000 rpm para eliminar los sólidos que interfieren en la lectura de absorbancia. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm y se graficó las unidades de absorbancia en función del tiempo (UAbs/seg). Se obtuvo el valor de las pendientes en la zona de crecimiento lineal de la absorbancia y se calculó la actividad en UI (micromoles de sustrato convertidos por minuto) de los biocatalizadores preparados. Se realizaron también ensayos blanco sin agregar el biocatalizador a la mezcla de reacción.

Dada las características del soporte elegido se puede considerar que su unión con la enzima es de naturaleza iónica y que la misma puede ser afectada en medios acuosos. Por este motivo, se analizó la posible desorción de la enzima de los biocatalizadores. Para ello se mezclaron 2,5 mg de CT con 17,1 ml de buffer y se dejaron en agitación durante 1h. Posteriormente se centrifugó 10 min a 0°C. Se separó el sobrenadante y se realizó la medida de actividad esterásica siguiendo el mismo protocolo descrito para los biocatalizadores.

3.2. Resultados

3.2.1. Inmovilización de CALB sobre TiO_2

3.2.1.1. Determinación de proteínas

En la **tabla 2** se muestran las cantidades de proteínas obtenidas por el método de Bradford y la actividad de cada fracción.

Ensayo	Muestra	Concentración	Proteínas *
CT	t ₀	0,56 mg/mL	11,3 mg
	SN1	0,07 mg/mL	1,4 mg
	SN2	-	-
CT*	t ₀	0,54 mg/mL	10,8 mg
	SN1	0,08 mg/MI	1,6 mg
	SN2	-	-

Tabla 2. Cuantificación de proteínas. Seguimiento de la inmovilización.

*En los 20 ml utilizados en la inmovilización

Los datos muestran una adsorción de proteínas al soporte mayor al 85% en ambos biocatalizadores. Esto indica que la mayor proporción de proteínas es inmovilizada en el soporte de TiO₂; se observa que la matriz absorbe una gran cantidad de enzima.

Estos datos indican que en 100 mg de soporte se inmovilizaron alrededor de 9,9 mg de proteínas en el biocatalizador CT (realizado con la enzima purificada), y 9,2 mg en CT* (realizado con el extracto crudo centrifugado de CALB). Dado que se observan proteínas remanentes en el sobrenadante podría considerarse que el soporte está saturado.

Mediante este método no se detectaron cantidades apreciables de proteínas en las medidas realizadas en SN2, lo que permite pensar que existe una unión fuerte entre la enzima y el soporte, ya que la misma no se desorbió al lavarse el biocatalizador.

3.2.1.2. Actividad esterásica

Se midió la actividad lipolítica de estas fracciones usando pNfL como sustrato. En la fracción t₀ de CT se midió una actividad de 0,173 UI, mientras que en el sobrenadante 1 (SN1) se midieron 0,037 UI.

Por lo tanto el 77,3% de CALB se absorbió en la matriz de TiO₂. En la fracción SN2 se observó actividad despreciable. Con CT* se encontraron valores similares en actividad esterásica (0,180 UI en la fracción t₀ y

0,045 UI en SN1), mostrando que más del 75% de la enzima fue adsorbida en la matriz.

3.2.2. Caracterización del biocatalizador

3.2.2.1. Retención de actividad

Los resultados obtenidos en la medida de actividad esterásica de los biocatalizadores CT (con la enzima purificada) dieron los siguientes valores promedio de 0,035 UI/mg de biocatalizador y de 0,421 UI/mg de enzima.

La enzima libre tiene una actividad específica de 3,09 UI/mg. Por lo cual, al realizar la inmovilización, se retiene un 14% de la actividad. Esta diferencia de actividades entre la enzima libre y la enzima inmovilizada puede atribuirse a una desnaturalización parcial de CALB al adsorberse en la matriz.

3.2.2.2. Desorción proteica

Durante el paso de lavado en la preparación de los biocatalizadores se determinó que la proteína desorbida desde el soporte fue insignificante, sin embargo, entendiendo que en la unión entre la enzima y el soporte la interacción iónica es muy importante, se realizaron ensayos para comprobar la posible desorción durante las medidas de actividad previamente descritas.

La medida de actividad realizada sobre el sobrenadante luego de una incubación del biocatalizador en el buffer acuoso a 37°C y con agitación magnética mostró una actividad de 0,171 UI/mg prot. Dicho valor constituye un 99 % del valor obtenido con el mismo biocatalizador presente. Estos valores se presentan en la tabla 3.

Ensayo	Act esp (UI/mg CT)	Act esp (UI/mg prot)	Porcentaje desorbido
Tiempo 0	0,0171	0,1726	-
Sobrenadante	0,0170	0,1713	99,4

Tabla 3. Desorción enzimática * Considerando la masa de CT con la que se inició el ensayo

La desorción es prácticamente completa en las condiciones ensayadas. Este resultado corrobora que la unión entre la enzima y el soporte es de naturaleza iónica.

En función de estos resultados no se realizó el ensayo de desorción ni el ensayo de actividad en el biocatalizador CT*, ya que de realizarlo no se estaría catalizando el biocatalizador sino la enzima desprendida del mismo.

3.3. Conclusiones

En el presente capítulo se desarrolló la preparación de biocatalizadores utilizando un método de inmovilización sencillo, rápido y económico.

Se observa que tanto la actividad enzimática como la concentración proteica son mucho mayores en la solución t_0 que en la SN1. Estos datos indican que en 100 mg de soporte se inmovilizaron alrededor de 9,9 mg de proteínas en el biocatalizador CT (realizado con la enzima purificada), y 9,2 mg en CT* (realizado con el extracto crudo centrifugado de CALB).

La fracción SN2 mostró una cantidad de proteínas y actividad enzimática despreciable lo que indica que esta no se desorbió en el lavado, mostrando que la enzima está firmemente unida a la matriz.

En los análisis de retención de actividad se observa que esta se conserva, aunque decae en gran medida. Este valor representa un 10%

de la actividad presentada por la enzima libre. Esta caída en la actividad puede deberse a una desnaturalización parcial por la interacción de la enzima con el sólido.

La caracterización del biocatalizador muestra una desorción de CALB de la matriz en medio acuoso con una fuerte concentración iónica en tiempos largos de incubación, lo cual estaría ligado a la unión iónica entre CALB y TiO_2 .

Estos resultados inhabilitan al biocatalizador para ser usado en medios acuosos, ya que las interacciones iónicas en esos medios provocarían la indeseada desorción enzimática.

ESTERIFICACIÓN DE IBUPROFENO

4. Esterificación de ibuprofeno

Como hemos visto, solo el S(+)-Ibuprofeno es biológicamente activo en el organismo. Sin embargo, la droga es administrada como racemato, introduciendo una dosis inactiva con efectos secundarios nocivos para la salud. La esterificación del R(-)-Ibuprofeno es una opción interesante para poder separar ambos enantiómeros y disminuir así el daño colateral por su consumo.

Con este objetivo se investigó la esterificación de (R/S)-ibuprofeno empleando etanol como agente nucleofílico utilizando los biocatalizadores preparados según lo descrito en el capítulo anterior (CALB purificada en TiO_2 y CALB del extracto crudo centrifugado en TiO_2). Para comparar la acción de los mismos, en paralelo, se ensayó el biocatalizador comercial Novozym® 435 basado también en CALB.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Aplicación de los biocatalizadores en la esterificación enantioselectiva de ibuprofeno

Para evaluar la capacidad de los biocatalizadores producidos en la esterificación enantioselectiva de ibuprofeno con etanol, se prepararon dos medios de reacción diferentes que se muestran en las **tablas 1.a.** y **1.b.** Se usó ibuprofeno Parafarm 99% y los solventes fueron isooctano Merck pro-analisis y etanol absoluto Carlo Erba pro-analisis,

Se ensayaron los siguientes biocatalizadores: Novozym® 435 (Novo), consistente en CALB adsorbida físicamente sobre esferas de poli(metilmecrilato) entrecruzado con divinilbenceno (LEWATIT VP OC 1600)^{64, 65}, CALB purificada sobre TiO_2 (CT) y el extracto crudo de CALB sobre TiO_2 (CT*)

Sin cosolvente (Relación molar Ibu:EtOH = 1:7)	
Biocatalizador	20 mg
Ibuprofeno	0,5 g
Etanol	1 mL

Tabla 1.a.

Con cosolvente (Relación molar Ibu:EtOH = 1:1)	
Biocatalizador	20 mg
Ibuprofeno	0,25 g
Etanol	0,07 mL
Isooctano	10 mL

Tabla 1.b.

Se realizaron ensayos blanco utilizando las mismas composiciones sin el agregado de biocatalizador.

Las mezclas se dejaron incubando a 45°C y agitación orbital (200 rpm) durante 48 hs. en frascos de vidrio color caramelo.

Al finalizar las 48 hs se retiraron muestras de 50 µL de cada ensayo para analizar la enantioselectividad. Se tituló el ibuprofeno remanente en las mezclas de reacción y en los blancos utilizando KOH 0,1 M en etanol absoluto y usando fenolftaleína como indicador del punto final.

Con los datos de volúmenes gastados en cada caso se calcularon los porcentajes de conversión de ibuprofeno a éster usando la siguiente fórmula:

$$\% C = \frac{(V_b - V_m) \times 100}{V_b}$$

Donde V_b = Volumen del Bco, V_m = Volumen de la muestra

A partir de las alícuotas de 50 µL se analizó por HPLC los contenidos remanentes de los isómeros del ibuprofeno en los ensayos donde hubo conversión y de los ensayos blanco. El análisis fue realizado usando una columna quiral Nucleodex beta-PM (Macherey-Nagel, Germany); la fase móvil fue la mezcla de metanol:buffer TEAA 0,1% pH 4,0 (60:40) y el flujo fue de 0,7 mL/min⁵⁶. Con los ensayos blanco se calculó el factor de corrección entre las áreas de ambos isómeros.

$$eeS\% = \frac{(S_S - S_R \times f) \times 100}{S_S + S_R \times f}$$

eeS%: exceso enantiomérico del sustrato; S_S : Sustrato S remanente; S_R : Sustrato R remanente; f : factor de corrección.

4.1.2. Estudio de la cinética de esterificación

Es importante saber cuál es el comportamiento del biocatalizador a distintos tiempos de reacción. Por un lado, saber si mantiene el nivel de actividad durante el proceso o si decae. Por otro, dada la preferencia enzimática hacia uno de los dos isómeros, es necesario conocer en qué tiempos de ensayo se logra la mejor enantioselectividad y, al mismo tiempo el mayor nivel de conversión.

En ese sentido, se realizó el seguimiento de la esterificación del ibuprofeno. Se obtuvieron las medidas de porcentaje de conversión (% C) y porcentaje de exceso enantiomérico S (ees%) a distintos tiempos.

Se eligió para este estudio la mezcla de reacción y el biocatalizador que mejores resultados dieron en la esterificación durante 48 hs.

Para cada tiempo ensayado se utilizó un frasco diferente con la misma mezcla de reacción y se siguió el protocolo descrito en la sección anterior. A las 6, 12, 24, 36 y 48 hs se retiraron, por duplicado, frascos para realizar los análisis de %C y eeS% de la misma forma que se describió previamente.

4.2. Resultados

4.2.1. Análisis de la esterificación de ibuprofeno

Se tituló el ibuprofeno remanente luego de la incubación de los distintos biocatalizadores y se analizaron por HPLC los contenidos remanentes de los

isómeros del ibuprofeno en los ensayos donde hubo conversión (Novo y CT*). Con estos datos se calcularon los resultados se muestran en la tabla 2.

Biocatalizador	Cosolvente	masa (gr)	% C	eeS%
CT	-	20	0	-
CT*	-	20	4,5	4,5
Novo	-	20	14,5	11,4
CT	Isooctano	20	3,6	-
CT*	Isooctano	20	69,0	56,9
Novo	Isooctano	20	67,5	50,1

Tabla 2. Conversión de ibuprofeno

Se observa un bajo porcentaje de conversión de ibuprofeno al realizar la reacción en etanol sin cosolvente con cualquiera de los biocatalizadores usados. Al realizarse la reacción con cosolvente se observa un aumento en la conversión de 14 veces utilizando CT* como biocatalizador y de aproximadamente 5 veces utilizando Novo como biocatalizador. Al agregar isooctano como cosolvente se observa conversión en el biocatalizador realizado con la enzima purificada, pero es despreciable frente a la conversión en los otros biocatalizadores. En cambio, el biocatalizador preparado con el extracto crudo se observan porcentajes de conversión similares a los observados en el biocatalizador comercial. También se observa que el porcentaje de exceso enantiomérico es levemente mayor.

La diferencia observada entre CT y CT* puede deberse a que en el paso de purificación de la cromatografía de exclusión se eliminaron componentes de la muestra comercial que actúen protegiendo a la enzima.

4.2.2. Estudio de la cinética de esterificación

En función de los resultados obtenidos se estudió la cinética de conversión de esterificación de ibuprofeno en el biocatalizador preparado con el extracto crudo centrifugado de CALB (CT*). Para esto se utilizó el medio de reacción con cosolvente, conteniendo isooctano y una relación molar 1:1 entre ibuprofeno y etanol.

En la **tabla 3** se registraron los siguientes valores de % C y eeS %:

Ensayo	Horas	% C	eeS %
6h A	6	5	9
6h B	6	5,1	8
12h A	12,33	11,8	24
12h B	12,33	9,2	15
24h A	24	20,9	15
24h B	24	21,2	14
36h A	37	37	23
36h B	37	38,6	23
48h A	47,66	50,7	33
48h B	47,66	53,9	39

Tabla 3. Conversión de ibuprofeno en CT*

Los valores obtenidos se muestran en un gráfico de % de conversión vs tiempo en la **figura 1**:

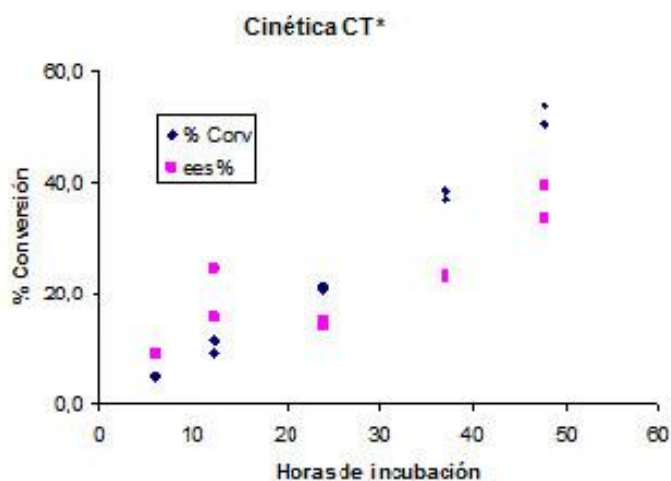


Figura 1. Cinética de conversión de CT*

En el rango de tiempo elegido se observa un aumento prácticamente lineal en la reacción de esterificación (%C) y un aumento algo menor de la enantioselectividad (eeS%). Al aumentar el tiempo de reacción antes de las 12hs el porcentaje de conversión aumenta, pero el porcentaje de exceso enantiomérico lo hace en mayor medida. A tiempos mayores sigue

aumentando el porcentaje de conversión, pero lo hace más rápidamente que el porcentaje de conversión enantiomérica.

4.3. Conclusiones

Se observó en todos los casos que el uso de isooctano como cosolvente aumenta considerablemente la conversión de ibuprofeno con respecto a los ensayos en ausencia de cosolvente.

El biocatalizador CT no muestra conversión a las 48hs en el medio sin cosolvente y sólo un 3,6% cuando se usa isooctano. En cambio, CT* y Novo muestran valores de conversión superiores al 50% en las mismas condiciones de ensayo.

El exceso enantiomérico de sustrato (eeS%) muestra valores levemente superiores al usar CT* que Novo como biocatalizador. Dicho valor fue máximo a las 48hs de ensayo.

Valores de %C mayores a 50% implicarían necesariamente una disminución en el eeS%. En ese sentido, de acuerdo a lo observado, se puede considerar resultados óptimos se obtienen usando tiempos entre 40 y 48 hs.

En este trabajo se consiguió preparar un biocatalizador de forma sencilla, rápida y económica basado en CALB. La enzima fue inmovilizada en un soporte TiO_2 y resultó poseer una actividad comparable con el biocatalizador comercial Novozym, el cual es ampliamente utilizado en la industria.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Llerena Suster C. R. F., Tesis Doctoral: *Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuso orgánicos*. 2011, LIPROVE. Fac Cs. Exactas. UNLP
- ² Anastas, P.T., Warner, J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. 1998. Oxford University Press, New York.
- ³ Guzmán F., Barberis S., Illanes A. *Electr. J. Biotech.* 2007. 10, 279-314
- ⁴ Pollard, D.J., Woodley J.M. *Trends in Biotechnol.* 2007. 5, 66-73
- ⁵ Adamczak, M., Hari Krishna, S. *Food Technol. Biotechnol.* 2004. 42, 251-64.
- ⁶ Sheldon, R.A., van Rantwijk, F., van Langen, L.M., Wegman, M.A., Cao, L., Janssen, M.H.A., *Biocatalysts and Biocatalysis in the synthesis of β -lactam antibiotics* en *Synthesis of β -lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis & process integration*. (Bruggink, A., Roy, P.D., eds.). 2001, Kluwer Acad Publ, Dordrecht
- ⁷ Woodley, J.M. *Tibtech.* , 2008, 26, 321-327
- ⁸ Bull, A.T., Bunch A.W., Robinson G.K. *Curr. Op. Microb.* 1999, 2, 246-251
- ⁹ Shin, G.H., Kim, C., Kim, H.J., Shin, C.S. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 2003, 26, 2001-208.
- ¹⁰ Morcelle del Valle, S., Tesis Doctoral: "Proteasas de látex de *Funarium clausum*. Caracterización y purificación y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos", 2004, LIPROVE, Fac Cs. Exactas, UNLP
- ¹¹ Carvalho P.O., Cass Q.B., Calafatti S.A., Contesini F.J., Bizaco R., *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2006, 23, 291-300.
- ¹² Waigner I.W., *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 2º ed., 1993, Marcel Dekker, New York.
- ¹³ Tseng S., Pak G., Washenik K., Keltz Pomeranz M., Shupack J. L., *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996, 35, 969-979.
- ¹⁴ Flórez J., *Farmacología Humana*, 3º ed. 1998. ISBN-10: 8445806130, ISBN-13, 978-8445806135, Barcelona, España, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A.
- ¹⁵ *IUBMB Nomenclature Homepage*. <http://www.iubmb.org/>, 6/6/2015

-
- ¹⁶ Bórgstrom B. y Brockman, H.L., *Lipases*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- ¹⁷ Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999, 29, 119-131.
- ¹⁸ Cygler M., Schrag J.D., Ergun F., *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 1992, 10, 143-184.
- ¹⁹ Cygler M., Schrag J.D., *Methods Enzymol.* 1997, 284, 3-27.
- ²⁰ Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D., *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 93, 67-80.
- ²¹ Arroyo-Sánchez M., Tesis doctoral: "Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas", 1995, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- ²² Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Van Heuvel M., Misset O., *FEMS Microbiol Rev.*, 1994, 15, 29-63.
- ²³ Arroyo M., *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2000, 19-24
- ²⁴ Alarcón Vivero M.R., Tesis doctoral: "Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis", 2008, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- ²⁵ Kirk O., Christensen M.W., *Organic Process Research & Development*, 2002, 6, 446-451.
- ²⁶ Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O., *Biocatal. Biotransform.* 1998, 16, 181-204.
- ²⁷ Schmid R.D., Verger R., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 1608-1633.
- ²⁸ Uppenberg J., Hansen M.T., Patear S., Jones T.A., *Structure* 1994, 2, 293-308.
- ²⁹ Uppenberg J., Oehrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G.J., Patkar S., Waagen V., Anthonsen T., Jones A., *Biochemistry* 1995, 34 (51), 16838-16851.
- ³⁰ Salis A., Svensson I., Monduzzi M., Solinas V., Adlercreutz P., *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1646, 145-151.
- ³¹ Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L., *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 380-382.

-
- ³² Ottoson J., Francsson L., King J.W., Hult K., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1594, 325-334.
- ³³ Wescott C.R., Klibanov A.M., *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1206,1-9
- ³⁴ Bordusa, F. *Chem. Rev.* 2007, 102, 4817-67.
- ³⁵ Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, XXX,81-87
- ³⁶ Barberis S., Illanes A., *Ing. Quim.*, 1996, 165-73.
- ³⁷ Quiroga E., Camí G., Marchese J., Barberis S. *Biochem. Eng. J.* 2007, 35, 198-202.
- ³⁸ Xu, K., Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 9815-9.
- ³⁹ Klibanov A., *Nature* 2001, 409, 241-6.
- ⁴⁰ Castro G.R., Knubovets T., *Critic. Rev. Biotechnol.* 2003, 23, 195-231.
- ⁴¹ Krieger N., Bhatnagar T., Baratti J., *Food Technol. Biotechnol.* 2004, 42, 279-86.
- ⁴² Clapés P., Morán C., Infante M.R., *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 63,333-343.
- ⁴³ Gerhartz, W. Enzymes in industry. Production and applications, 1990, Ed. Síntesis, Madrid.
- ⁴⁴ Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. Industrial Biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH. 2000
- ⁴⁵ Llerena-Suster C.R.F., Foresti M.L., Briand L.E., Morcelle S.R. *Coll Surf B: Biointerfaces*, 2009, 72,1 16-24,
- ⁴⁶ Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. *Eur. J. Biochem.* 1988, 172, 523-78.
- ⁴⁷ Quiroga E., Obregón W.D., Illanes A. Inmovilización de fitoproteasas. En Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales. (Caffini, N.O., ed.). 2009, 1a ed. - Buenos Aires, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
- ⁴⁸ Illanes A., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M., Wilson L.. Heterogeneous enzyme kinetics, In Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications (A. Illanes, Ed.) 2008 Springer Science, UK.
- ⁴⁹ Godia Casablanca, F., López-Santín, J. in: Godia-Casablanca, J. López-Santín (Eds.), Ingeniería bioquímica, 1998, Editorial Síntesis, Madrid

-
- ⁵⁰ Wahlgren, M., Arnebrant T. *Trends Biotechnol.* 1991, 9, 201-208.
- ⁵¹ Ferreira L., Ramos, M.A., Dordick, J.S, Gil, M.H. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 2003, 21, 189-99.
- ⁵² Pascucci R.A., *JAOA* 2002, 102 (9) 487-489.
- ⁵³ Adams S.S., Bresloff P., Manson G.C., *J Pharm. Pharmacol* 1976, 28, 256–257.
- ⁵⁴ Boyce E., Takiya L., *Formulary* 2000, 35, 142-168
- ⁵⁵ Stinson S.C. *Chiral Drugs. Product Report in C&EN Northeast News Report*, October 9, 1995, 44-74.
- ⁵⁶ Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 1461-1473.
- ⁵⁷ José, C. Tesis Doctoral: "Resolución biocatalítica de enantiomeros del ibuprofeno", 2013, Fac Cs. Exactas, UNLP
- ⁵⁸ Rottici-Mulder J.C., Gustavsson M., Holmquist M., Hult K., Martinelle M. *Protein Express Purif.*, 2001, 21386-392
- ⁵⁹ GRAS notification regarding Lipozyme (R) CALB L provided by Novozymes North America to the Food and Drug Administration (LUNA No. 2004-39073-01; October 4, 2004).
- ⁶⁰ Zhao H., Song Z., *Biochem. Eng. J.* 2010, 49, 113
- ⁶¹ Llerena-Suster C.R. , Briand L.E., Morcelle S.R., *Current catalysis*, 2014, 155-160
- ⁶² Bradford M.M. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254
- ⁶³ Llerena-Suster C.R., Briand L. E., Morcelle S. R. *Coll Surf B: Biointerfaces*, 2014, 121, 11-20
- ⁶⁴ Chen B., Hu J., Miller E.M., Xie W., Cai M., Gross R.E., *Biomacromolecules* 2008, 9, 463-471
- ⁶⁵ Cabrera Z., Fernández-Lorente G., Fernandez-Lafuente R., Palomo J.M., Guisan J.M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2009, 57, 171-176.